

**PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2022”**  
**RELAZIONE FINALE**

**N. identificativo progetto: IZS LT 03/22 RC**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE**

**LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”**

**Area tematica: Sanità Animale**

**Titolo del progetto: Sviluppo di metodiche molecolari per l’early detection di parassiti endocellulari dei pesci**

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

**Responsabile Scientifico: Gianluca Fichi**

## SINTESI

### *Sviluppo di metodiche molecolari per l'early detection di parassiti endocellulari dei pesci*

Parole chiave: micro/myxosporidi, pesci, early detection

Il presente studio ha valutato la presenza di endoparassiti emergenti nei principali pesci d'acquacoltura italiani (branzino e orata) e nel modello sperimentale zebrafish, con particolare attenzione a microsporidi e mixosporidi noti per formare xenomi e causare rilevanti perdite produttive. Su 405 soggetti sottoposti a esame anatomopatologico, diagnostica parassitologica e analisi molecolari, non sono stati identificati xenomi né endoparassiti microsporidici o mixosporidici, eccetto un sospetto mixosporidio nelle feci di orata. Le PCR real-time sviluppate che utilizzano la tecnica in SYBR Green per *Enteromyxum leei* ed *E. nucleophila* hanno generato diversi falsi positivi, mentre le PCR end-point si sono dimostrate più affidabili. Tutti gli zebrafish testati sono risultati negativi a *Pseudoloma neurophilia*. È stata invece rilevata un'elevata prevalenza del protozoo ciliato *Cryptocaryon irritans* in branzino e orata. La PCR real-time per *C. irritans* ha rilevato un numero di positivi più che doppio rispetto alla microscopia, e si è dimostrata utile anche per il rilevamento del DNA di questo parassita dall'acqua in uscita delle vasche anche in assenza di infezione manifesta nei pesci, rivelandosi un valido strumento per l'early detection. Una scoping review ha inoltre documentato 113 specie ittiche affette da xenomi, confermando la microscopia ottica come principale metodo diagnostico utilizzato. I risultati evidenziano invece la necessità di tecniche molecolari validate per il monitoraggio degli endoparassiti ittici e propongono una procedura operativa standard per la PCR di *C. irritans* a supporto della diagnosi precoce in acquacoltura.

## SUMMARY

Development of molecular methods for the early detection of intracellular parasites in fish

Key words: micro/myxosporidia, fish, early detection

This study evaluated the presence of emerging endoparasites in the main Italian aquaculture fish (sea bass and sea bream) and in the experimental zebrafish model, with particular attention to microsporidia and myxosporea known to form xenomas and cause significant production losses. Out of 405 subjects subjected to anatomopathological examination, parasitological diagnosis and molecular analysis, no xenomas or microsporidian or myxosporidian endoparasites were identified, except for a suspected myxosporidian in the faeces of sea bream. The real-time PCRs developed using the SYBR Green technique for *Enteromyxum leei* and *E. nucleophila* generated several false positives, while end-point PCRs proved to be more reliable. All zebrafish tested were negative for *Pseudoloma neurophilia*. However, a high prevalence of the ciliate protozoan *Cryptocaryon irritans*

was detected in sea bass and sea bream. Real-time PCR for *C. irritans* detected more than twice as many positives as microscopy and also proved useful for detecting the DNA of this parasite in the water leaving the tanks, even in the absence of overt infection in the fish, proving to be a valuable tool for early detection. A scoping review also documented 113 fish species affected by xenomas, confirming optical microscopy as the main diagnostic method used. The results highlight the need for validated molecular techniques for monitoring.

## INTRODUZIONE

Le perdite economiche per infestazioni da ecto-parassiti sono ben documentate negli allevamenti ittici fin dal loro sviluppo, ma dalla fine del XX secolo, le principali perdite economiche con eziologia parassitaria in questi allevamenti sono legate all'aumento della prevalenza di endo-microparassiti (1). Microsporidia e myxosporidia, sono parassiti endocellulari formanti xenoma, lesione che coinvolge la risposta immunitaria dell'ospite, e che causano problematiche serie come la whirling disease e la PKD nei salmonidi. Conseguenza di ciò sono ingenti perdite in allevamenti di specie marine come spigola, orata e rombo (2, 3), ma anche in specie di acqua dolce come i salmonidi (4, 5). Inoltre, nello zebrafish (6, 7), specie largamente impiegata come modello animale nella ricerca medica, veterinaria e zootecnica (acquacoltura in primis), alterano la risposta neurocomportamentale (8, 9), con casi di possibile alterazione dei risultati scientifici. Per questi parassiti, non esistono ad oggi farmaci o vaccini (8) e pertanto, la prevenzione e l'early detection diventano fondamentali. I microsporidia, parassiti con ciclo diretto, infettano quasi tutti gli invertebrati e i vertebrati, compreso l'uomo, e le spore sono ubiquitarie nelle acque superficiali e nell'ambiente (10). Per molti myxosporidia, invece, il ciclo non è ancora stato chiarito ma sembra sia legato alla presenza di un ospite intermedio invertebrato (11).

Mentre l'acquacoltura si sta espandendo in tutto il mondo, le infezioni da microsporidia e myxosporidi continuano a causare ingenti perdite economiche e vi è ancora una considerevole mancanza di informazioni riguardo il loro ciclo, la loro biologia, la patogenesi e la risposta immunitaria dell'ospite alle loro infezioni. La diagnosi di questi parassiti endocellulari coinvolge l'identificazione delle caratteristiche spore nei tessuti target e l'osservazione dei pochi segni caratteristici. All'esame anatomopatologico le lesioni si possono presentare come granulomi o cisti, definiti per questi parassiti xenomi, con discolorazione del tessuto. Alterazioni tissutali simili sono però proprie di molti patogeni nei pesci e non sempre sono osservabili ad occhio nudo. Per una diagnosi certa sono necessari l'esame a fresco dei tessuti mediante microscopia ottica o altri test come l'istopatologico o il molecolare (PCR) che possono essere eseguiti solo da laboratori altamente specializzati. Ad oggi sono state identificate più di 156 specie di microsporidi nei pesci e tra le oltre 2000 specie di myxosporidi descritte, la maggior parte colpiscono gli organismi acquatici. A fronte